QMS® Tacrolimus Immunoassay

Thermo SCIENTIFIC

REF 10015556

Solo para uso en *diagnóstico in vitro*

Consulte este prospecto detenidamente antes de utilizar el Sistema de microesferas para análisis cuantitativo (QMS). Deben seguirse las instrucciones incluidas en el prospecto tal y como vienen indicadas. No se garantiza la fiabilidad de los resultados del ensayo si existen desviaciones con respecto a las instrucciones contenidas en este prospecto.

INDICACIONES

El inmunoensayo de tacrolimus QMS está destinado a usarse en la determinación cuantitativa de tacrolimus en sangre completa humana, mediante analizadores automáticos de bioquímica clínica. Los resultados que se obtengan se utilizarán para ayudar en el tratamiento de pacientes de trasplante de riñón, hígado y corazón que estén sometidos a terapia con tracolimus. Este dispositivo de diagnóstico *in vitro* está indicado solo para uso en laboratorio clínico.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El tacrolimus (FK506, PROGRAF®) es un antibiótico macrólido de origen fúngico, *Streptomyces tsukubaensis,* con potentes efectos inmunosupresores tal como se prescribe para pacientes sometidos a trasplante de riñón e hígado.[1] El tacrolimus es un inhibidor de la calcineurina, una fosfatasa que activa la proliferación de los linfocitos.[2-4] A nivel celular, el tacrolimus se une a una familia de proteínas de unión denominadas FKBP (proteínas de unión FK506) y, a continuación, forma un complejo pentamérico que incluye tacrolimus, FKBP, calcineurinas A y B, y calmodulina.[2-5] La formación del pentámero produce la inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina, necesaria para activar factores de transcripción para el transporte al interior del núcleo celular. Así, la expresión genética de los linfocitos T se ve especialmente afectada por citocinas tales como la IL-2, lo que produce un efecto inmunosupresor en los pacientes.[2-5]

La distribución del tacrolimus entre la sangre entera y el plasma depende de varios factores, tales como el hematocrito, la concentración de fármaco y la concentración de proteínas plasmáticas. La media del cociente entre las concentraciones en sangre entera y en plasma fue de 35 (intervalo de 12 a 67).[6-7] El tacrolimus es metabolizado en gran medida por el sistema del citocromo P-450, principalmente CYP3A.[8-11] Se metaboliza el fármaco en al menos 8 metabolitos (M-I – M-VIII) mediante desmetilación e hidroxilación.[12] La semivida media estimada del tacrolimus in vivo es de 48 horas.[8-11] También se ha informado de la existencia de una gran variabilidad tanto intrapacientes como interpacientes en las concentraciones de tacrolimus en sangre entera.[13] Se recomienda un control cuidadoso y frecuente del tacrolimus.[14]

FUNDAMENTOS DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo QMS Tacrolimus es un inmunoensayo turbidimétrico potenciado mediante partículas homogéneas. El ensayo está basado en la competencia que existe entre el fármaco presente en la muestra y el que recubre la micropartícula, por los sitios de unión a los anticuerpos específicos del anticuerpo unido a tacrolimus. El reactivo formado por micropartículas recubiertas de tacrolimus se aglutina rápidamente en presencia del reactivo anti-tacrolimus, en ausencia de cualquier fármaco competidor en la muestra. El índice de cambio de la absorbancia se mide mediante espectrofotometría a 700 nm. Cuando se añade una muestra que contiene tacrolimus, se inhibe parcialmente la reacción de aglutinación, ralentizando así la tasa de cambio de la absorbancia. Se puede obtener una curva clásica de inhibición de la aglutinación dependiente de la concentración, utilizando la tasa máxima de aglutinación a la menor concentración de tacrolimus, y la menor tasa de aglutinación a la máxima concentración de tacrolimus.

REACTIVOS

Kit de reactivos

QMS Everolimus, **REF** 10015556, se presenta en un kit que consta de tres reactivos líquidos, listos para su uso, que contiene:

REAGENT 1 1 x 18 mL
REAGENT 2 1 x 12 mL
EXT Reactivo de extracción 1 x 50 mL

Compuestos reactivos

INGRED	Componente	Concentración
REAGENT 1	Anticuerpo policlonal contra tacrolimus (conejo)	< 1,0%
	Azida sódica	0,09%
REAGENT 2	Micropartículas recubiertas de tacrolimus	<0,3%
	Azida sódica	0,09%
EXT	Azida sódica	0,09%

MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

- **REAGENT 1** , **REAGENT 2** y **EXT** (Reactivo de extracción) Listo para su uso
- Inviértase varias veces antes del uso, para evitar que se formen burbujas.
- Retirar las burbujas de aire que haya en el frasco de reactivo. O, como alternativa, deje reposar el reactivo a la temperatura de conservación adecuada para que las burbujas se disipen. Para minimizar la pérdida de volumen de líquido, no utilice pipetas de transferencia para quitar las burbujas.
- Cuando el frasco de reactivo **REAGENT 1** o **REAGENT 2** se gaste, reemplazar ambos reactivos y comprobar la calibración con al menos una muestra de cada nivel de controles conforme a lo dispuesto en los requisitos de control de calidad de su laboratorio. Si los controles dan como resultado valores fuera de los límites aceptables, puede que se necesite recalibrar.
- Consultar la hoja de parámetros del sistema para el ensayo, específica del analizador, para obtener información sobre la estabilidad del reactivo utilizado y también información específica del sistema.

⚠ **ATENCIÓN:** Las burbujas de reactivo pueden interferir en la adecuada detección del nivel de reactivo en el frasco, provocando una succión insuficiente de reactivo que podría afectar a los resultados.

2°C 8°C Los reactivos sin abrir son estables hasta su fecha de caducidad, si se almacenan a una temperatura de entre 2 y 8 °C.

No congelar los reactivos ni exponerlos a temperaturas superiores a 32 °C.

⚠ ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Solo para uso en diagnóstico *in vitro*. Ejercitar las precauciones habituales necesarias para la manipulación de todos los reactivos de laboratorio.
- No mezclar materiales de kits con diferentes números de lote.
- No utilizar los kit de reactivos más allá de su fecha de caducidad.

⚠ **ATENCIÓN:** Se han llevado a cabo análisis en los materiales de origen humano para comprobar la existencia de HIV1 y 2, Hepatitis B y Hepatitis C según un método aprobado por la FDA,y los resultados fueron negativos. No obstante, dado que ningún método puede descartar con absoluta certeza el riesgo de posible infección, debe manipularse el material con el mismo cuidado con que se manipula la muestra de paciente. En caso de exposición, deben seguirse las directivas de los responsables sanitarios.

⚠ **ATENCIÓN:** Xn Los reactivos incluidos con el inmunoensayo QMS Tacrolimus contenían menos de un 0,1% de azida sódica. Evítese el contacto con piel y membranas mucosas. Aclarar las zonas afectadas con abundante agua. Buscar asistencia médica inmediata si se ingieren reactivos o si han entrado en contacto con los ojos. La azida sódica puede reaccionar con tuberías de plomo o de cobre formado azidas metálicas potencialmente explosivas. Al desechar estos reactivos, se debe aclarar siempre con un gran volumen de agua para evitar la acumulación de azidas. Limpiar las superficies metálicas expuestas con una solución de hidróxido sódico al 10%.

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

- Solo pueden utilizarse muestras de sangre completa recogidas en tubos EDTA. Siga las indicaciones de procesamiento del fabricante para todos los tubos de recogida de muestras. Debe prestarse especial cuidado a la integridad de la muestra desde el momento de la recogida hasta la realización del ensayo. Deberían etiquetarse las muestras con la hora de la recogida de sangre y de la última administración del fármaco.
- Se deben tapar y analizar las muestras en un plazo de 7 días si se almacenan a una temperatura de 2 a 8 °C o en un plazo de 6 meses si se almacenan a ≤ -20 °C.[6,10-11] Evitar congelar y descongelar repetidamente. No inducir la formación de espuma en las muestras.
- La luz puede afectar a la estabilidad de las muestras. Mantener las muestras alejadas de la luz.

PROCEDIMIENTO

Materiales proporcionados

• Kit de reactivo de tacrolimus QMS, REF 10015556

Materiales necesarios, pero no incluidos

• Calibradores QMS Tacrolimus, REF 10015573, CAL A: 1 x 4 mL, CAL B-F: 1 x 2 mL cada uno
• Productos con control de calidad
  Materiales recomendados:
  • Controles Rap/Tac/CsA de MORE Diagnostics,
    Nivel 1, 280-1: 4 x 4 mL cada uno
    Nivel 2, 280-2: 4 x 4 mL cada uno
    Nivel 3, 280-3: 4 x 4 mL cada uno
  • Bio-Rad Lyphocheck® Controles inmunodepresores de sangre completa,
    Nivel 1, 274: 6 x 2 mL cada uno
    Nivel 2, 275: 6 x 2 mL cada uno o nivel 4, 277: 6 x 2 mL cada uno
    Nivel 3, 276: 6 x 2 mL cada uno
    Nivel 5, 278: 6 x 2 mL cada uno o minipack nivel 5, 279X: 5 x 2 mL cada uno
  • Para otros productos de control de calidad disponibles en el mercado, ponerse en contacto con el departamento de asistencia técnica de Thermo Fisher Scientific
• Metanol, grado HPLC (≥ 99,8% de pureza)
• Tubos de microcentrífuga con baseredondeada
• Analizador químico clínico automatizado

Preparación de la muestra

Nota: Para realizar los controles, siga las instrucciones y las recomendaciones de manipulación específicas del proveedor en el prospecto del envase, si se incluyen.

Antes de la extracción, esperar a que los calibradores y las muestras de pacientes alcancen la temperatura ambiente. Antes de utilizarlos, se deben mezclar bien los calibradores y las muestras de pacientes durante un periodo de 15 a 20 minutos y a temperatura ambiente. Mezclar bien los calibradores y las muestras de pacientes invirtiéndolos suavemente (se recomienda utilizar un oscilador). Evitar que se formen burbujas.

Preparación de la solución de extracción

1. Añadir exactamente 10 mL de reactivo de extracción a temperatura ambiente en un frasco limpio, seco y hermético.
2. Añadir exactamente 40 mL de metanol de grado HPLC (≥ 99,8% de pureza) al frasco y mezclar suavemente. Etiquetar como "solución de extracción de trabajo de tacrolimus". Anotar la fecha actual y la fecha de caducidad (2 semanas a partir de la fecha de fabricación) en la etiqueta. Conservar a temperatura ambiente.

Procedimiento de extracción para muestras, calibradores y controles.

PARA OBTENER UNOS RESULTADOS ÓPTIMOS, SIGA ESTOS PASOS CON TOTAL EXACTITUD. DEBEN PROCESARSE LOS EXTRACTOS INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE SU OBTENCIÓN.

1. Preparar y etiquetar los tubos de microcentrífuga de base redondeada para la extracción de las muestras, calibradores y controles. Preparar un tubo de microcentrífuga para cada muestra.
2. Utilizar una pipeta para medir exactamente 200 µL de muestra, calibrador o materiales de control en el tubo de microcentrígua etiquetado. Succionar la muestra con la pipeta, pasar suavemente la punta de la pipeta por el borde del vial de la muestra para eliminar cualquier exceso de muestra y, a continuación, añadir la muestra al lado interior del tubo de microcentrífuga. **Nota:** Compruebe la punta de la pipeta para asegurarse de que no tiene burbujas de aire. El aire en la punta puede causar imprecisiones.
3. Utilice una pipeta para medir exactamente 200 µL de solución de extracción en el tubo de microcentrífuga. Al preparar varias muestras, se recomienda una pipeta repetidora para succionar y añadir la solución de extracción. Eliminar todas las burbujas de aire de la punta de la pipeta antes de añadir la solución de extracción.
4. Tapar y agitar de inmediato en un vórtex el tubo de microcentrífuga a la máxima velocidad durante un periodo de 15 a 30 segundos. Comprobar que todos los tubos tienen una mezcla homogénea. Si se detecta que hay una muestra sin mezclar, separar la parte no mezclada y vuelva a agitar en el vórtex.
5. Dejar que la mezcla del tubo de microcentrífuga se asiente a temperatura ambiente durante un periodo de 5 a 7 minutos.
6. Colocar el tubo en una centrífuga y centrifugar durante 5 minutos a 13.000 rpm.
7. Decantar el sobrenadante en un recipiente de muestras adecuado (evitar que se formen burbujas) e inmediatamente realizar la medición para reducir al mínimo la evaporación de la muestra. No golpear el recipiente para soltar la última gota de forma que pueda perjudicar a la bola.
8. Desechar todos los extractos durante el análisis. Analizar de nuevo las muestras requiere extracciones frescos.

Nota: También se dispone de más sugerencias y recomendaciones de pasos para extracción de muestras del inmunoensayo QMS tracolimus en el departamento de asistencia técnica de Thermo Fisher Scientific.

Procedimiento de ensayo

Para obtener una descripción detallada de cómo realizar y calibrar un ensayo, consulte el manual de instrucciones específico del instrumento.

Procedimiento de dilución de muestras

Emplear QMS tacrolimus CAL A (0,0 ng/mL) para diluir manualmente las muestras fuera del intervalo lineal del ensayo.

Protocolo de dilución manual

Se pueden diluir manualmente las muestras de pacientes que tengan concentraciones de tacrolimus mayores de 30 ng/mL diluyendo la muestra del paciente con QMS tacrolimus CAL A (0,0 ng/mL) en una proporción 1:1 antes de extraer la muestra. Debe diluirse, ya que la prueba con la muestra diluida ofrece una sensibilidad mayor que la del ensayo, que es de 1 ng/mL. La concentración obtenida deberá multiplicarse entonces por el factor de dilución manual para obtener la concentración final de muestra.

Concentración final de la muestra = Concentración obtenida x Factor de dilución manual

Factor de dilución manual = (Volumen de muestra + Volumen de CAL A) ÷ Volumen de muestra

CALIBRACIÓN

El inmunoensayo QMS tracolimus debe calibrarse utilizando un método de calibración completa (6 puntos). Para realizar una calibración completa, pruebe los calibradores de QMS tracolimus A, B, C, D, E y F. Solo deben utilizarse calibradores QMS Tacrolimus con el inmunoensayo QMS Tacrolimus. No se puede obtener una determinación cuantitativa exacta de tacrolimus si no se usan los calibradores QMS Tacrolimus, REF 10015573, en la calibración del inmunoensayo QMS Tacrolimus.

Es necesaria una calibración con cada nuevo número de lote. Verificar la curva calibración con al menos una muestra de cada nivel de controles, según lo dispuesto en los requisitos de control de calidad de su laboratorio. Si los controles ofrecen resultados fuera de los límites aceptables, deberán adoptarse las medidas correctivas que procedan.

Nota: Se incluye en cada kit de calibradores una tarjeta con la asignación de valores por calibrador. Antes de utilizar un nuevo kit de calibradores, compruebe los parámetros químicos para asegurarse de que las concentraciones de calibradores coinciden con los valores impresos en la tarjeta de asignación de valores.

Frecuencia de calibración

Se recomienda la recalibración

- Después del cambio del lote del calibrador o del reactivo (kit)
- Después de realizar el mantenimiento mensual del instrumental
- Tal como estipulen los siguientes procedimientos de control de calidad

CONTROL DE CALIDAD

Todos los requisitos de control de calidad se ajustarán a las normas o a los requisitos de acreditación locales, regionales y/o nacionales.

Siempre que proceda, consulte los procedimientos estandarizados de trabajo y/o el plan de garantía de calidad de su laboratorio para conocer otros requisitos de control de calidad y las posibles medidas correctivas.

Requisitos recomendados de control para el inmunoensayo QMS Tacrolimus:

- Se debe realizar al menos una muestra de cada nivel de controles cada vez que se extraen y analizan pruebas de pacientes.
- Si se necesita monitorizar los controles de manera más frecuente, se recomienda seguir los procedimientos de control de calidad establecidos en su laboratorio.
- Todos los requisitos de control de calidad se ajustarán a las directrices o a los requisitos de acreditación locales, regionales y/o nacionales.
- Si los resultados del control de calidad no están dentro de los límites aceptables definidos por su laboratorio, los valores de los pacientes podrían no ser los correctos y no deberían reflejarse. Deberán adoptarse medidas correctivas.

RESULTADOS

Los resultados del inmunoensayo QMS Tacrolimus se dan en ng/mL.

Informes de los resultados: Los laboratorios deberían informar que los resultados se obtienen mediante el método de QMS Tacrolimus.

Códigos de error de los resultados:

Algunos resultados pueden contener códigos de error de resultados. Consulte el manual de instrucciones específico del instrumento para obtener una descripción de los códigos de error.

LIMITACIONES DE LOS PROCEDIMIENTOS

- Las concentraciones de tacrolimus en una muestra dada, determinada con ensayos de distintos fabricantes, puede variar como consecuencia de las diferencias en los métodos de análisis y en la especificidad del reactivo. Se recomienda un control uniforme con un ensayo.
- **Los inmunoensayos no son específicos ni de reactividad cruzada con metabolitos. Como consecuencia, los inmunoensayos pueden sobreestimar la concentración de tacrolimus (véase la sección de comparación de métodos). Cuando la eliminación de tacrolimus es reducida, se pueden acumular metabolitos en mayor medida y provocar una sobreestimación aún mayor. En estos casos, se debería plantear el uso de un ensayo específico (por ejemplo, el método cromatográfico).**

- Pueden aparecer anticuerpos heterófilos interferentes, con poca frecuencia, en la población. Estos anticuerpos pueden conducir a resultados erróneos (incluidos resultados erróneamente bajos debidos a la aglutinación de reactivo).
- Los hallazgos de la prueba deberán siempre tenerse en cuenta junto con la historia médica del paciente, los exámenes clínicos y otros hallazgos. Si los resultados no concuerdan con los datos clínicos, deberían realizarse análisis adicionales para confirmar los resultados.
- Consulte en prospecto del envase de PROGRAF los efectos de la administración combinada de fármacos, y de fármacos que pueden aumentar o reducir las concentraciones de tacrolimus.[14]

VALORES ESPERADOS

Con este ensayo no se ha establecido el intervalo terapéutico óptimo para tacrolimus en sangre completa. Los intervalos terapéuticos de tacrolimus pueden variar en función de factores clínicos y de la metodología utilizada.

Dado lo heterogéneo del estado clínico de los pacientes, los médicos deberían establecer el intervalo de control terapéutico que deseen en función de su experiencia y de las necesidades clínicas de cada paciente. Los cambios en el tratamiento no deberían basarse exclusivamente en los valores de tacrolimus. Las diferencias en la sensibilidad frente a los efectos inmunosupresores y nefrotóxicos del tacrolimus, la coadministración de otros inmunosupresores, el tipo de trasplante, la duración del periodo posoperatorio, y toda una serie de distintos factores contribuyen a la necesidad de diferentes requisitos para obtener unas niveles sanguíneos óptimos de tacrolimus.

Los intervalos óptimos pueden variar dependiendo de la prueba utilizada y, por lo tanto, se deberían establecer para cada prueba comercial. Los valores obtenidos mediante diferentes ensayos no pueden usarse de manera intercambiable, dadas las diferencias metodológicas y la reactividad cruzada, ni tampoco deben emplearse factores de corrección. Se recomienda utilizar un ensayo de manera individual para cada paciente.

CARACTERÍSTICAS ESPECIALES DE FUNCIONAMIENTO

A continuación se muestran resultados representativos del procedimiento del ensayo, obtenidos en un analizador automático de la bioquímica clínica, disponible comercialmente, que utiliza un análisis turbidimétrico cuantitativo. A menos que se indique lo contrario, todos los ensayos han sido realizados según el procedimiento de ensayo aquí incluido y utilizando el analizador Beckman AU680. Los resultados obtenidos laboratorios individuales pueden diferir de estos datos. Para obtener más información sobre el funcionamiento concreto de un analizador, consultar el protocolo de aplicación específico del analizador o pedir ayuda al departamento técnico de Thermo Fisher Scientific.

Intervalo recogido en los informes

El intervalo recogido en los informes para el inmunoensayo QMS Tacrolimus es de 1 ng/mL (valor mínimo que debe recogerse en los informes dependiendo de la sensibilidad funcional) a 30 ng/mL tacrolimus.

Sensibilidad funcional (Límite de cuantificación)

La sensibilidad funcional representa la concentración más baja de tacrolimus que puede medirse con una precisión interensayo de 20% CV. El estudio se realizó utilizando muestras de sangre completa a las que se añadió tacrolimus en un intervalo del 0,5 al 5,0 ng/mL para una medida cada vez, dos veces al día, durante 30 días y con un total de 60 puntos de datos. En el límite de confianza superior de 95 %, se calculó que el límite de cuantificación (LOQ) era de 0,9 ng/mL, que admite el límite inferior del ensayo de 1,0 ng/mL. La recuperación porcentual observada a 0,9 ng/mL es del 102,0%.

Linealidad de dilución

Se realizó un estudio de linealidad diluyendo una muestra de tacrolimus de alta concentración con el calibrador QMS Tacrolimus A a concentraciones distribuidas uniformemente en el intervalo del ensayo. El porcentaje de recuperación se determinó dividiendo la concentración de tacrolimus medico por la concentración prevista. Las concentraciones previstas se determinaron utilizando la alta concentración probada multiplicada por un factor de dilución.

% de muestra elevada	Concentración prevista (ng/mL)	Concentración medida (ng/mL)	Recuperación (%)
100,0%	29,9	29,9	100,0%
90,0%	26,9	26,0	96,8%
80,0%	23,9	22,8	95,4%
70,0%	20,9	19,2	91,8%
60,0%	17,9	17,2	96,1%
50,0%	14,9	14,7	98,6%
40,0%	12,0	11,1	92,7%
30,0%	9,0	8,6	95,7%
20,0%	6,0	6,0	100,0%
10,0%	3,0	3,1	102,9%
5,0%	1,5	1,5	100,4%
3,3%	1,0	1,0	101,4%

Tabla (continuación)

% de muestra elevada	Concentración prevista (ng/mL)	Concentración medida (ng/mL)	Recuperación (%)
2,8%	0,8	0,8	99,6%
0,0%	0,0	0,0	N/A

Concentración prevista = % de muestra de concentración elevada x concentración medida elevada
Recuperación (%) = (Concentración medida ÷ Concentración prevista) x 100

Recuperación

Se añadió a las muestras de sangre completa negativa cantidades de tacrolimus a concentraciones conocidas en todo el intervalo de ensayos. Las concentraciones de tacrolimus de estas muestras fueron comprobadas por un LC-MS/MS y probadas con el inmunoensayo QMS Tacrolimus. Los resultados se muestran a continuación.

ID de la muestra	n	Concentración prevista (ng/mL)	Concentración medida (ng/mL)	Recuperación (%)
Muestra 1	21	2,7	2,7	101,8
Muestra 2	21	9,8	10,8	109,4
Muestra 3	21	18,0	17,7	98,2
Muestra 4	21	19,8	21,3	107,5
Muestra 5	21	27,0	27,1	100,4

Recuperación (%) = (Concentración medida ÷ Concentración prevista) x 100

Precisión

Se evaluó la precisión utilizando muestras de sangre completa de pacientes adicionadas y agrupadas. El estudio se realizó tal como se describe en el protocolo CLSI EP5-A2.[15] Cada muestra se ensayó por duplicado cada vez, dos veces diarias durante 20 días. Se calculó la SD y el % de CV medios, intraensayos y totales. A continuación se muestran los resultados representativos del estudio.

Muestras	n	Media (ng/mL)	Intraensayo		Ensayo total	
			SD	% CV	SD	% CV
Muestra adicionada A	80	3,0	0,2	4,9%	0,2	7,1%
Muestra adicionada B	80	10,0	0,2	1,9%	0,4	3,6%
Muestra adicionada C	80	20,9	0,4	1,9%	1,1	5,0%
Muestra de paciente A	80	3,2	0,1	4,1%	0,2	6,2%
Muestra de paciente B	80	10,4	0,2	2,2%	0,4	3,6%
Muestra de paciente C	80	24,2	0,5	2,1%	1,1	4,6%

Comparación de métodos

Se realizaron estudios de correlación para comparar el inmunoensayo QMS Tacrolimus con dos métodos LC-MS/MS (sistema 1 y sistema 2) y el ensayo Abbott ARCHITECT® Tacrolimus. En los estudios se utilizaron muestras EDTA de sangre humana completa obtenidas de pacientes con trasplante de riñón, hígado y corazón que tomaban tacrolimus. Todas las muestras analizadas procedían principalmente de pacientes adultos con un trasplante de la muestra que generalmente > 9 meses. A los pacientes analizados se les administró un tratamiento de fármacos de tacrolimus solo o combinado con otros fármacos inmunodepresores, principalmente micofenolato de mofetilo (MMF), ácido micofenólico (MPA), sirolimus, everolimus o corticosteroides. Los resultados del análisis de regresión Deming[16] entre los distintos métodos se muestran en la tabla siguiente.

Método comparativo	n	Pendiente (IC* 95 %)	Intersección (IC 95 %)	Coeficiente de correlación (R)
LC-MS/MS sistema 1	383	1,111 (de 1,084 a 1,137)	0,53 (de 0,31 a 0,76)	0,972
LC-MS/MS sistema 2	232	1,130 (de 1,092 a 1,167)	0,71 (de 0,42 a 1,01)	0,967
Ensayo Abbott ARCHITECT Tacrolimus	208	1,126 (de 1,071 a 1,181)	-0,03 (de -0,63 a 0,56)	0,937

*Intervalo de confianza (IC)
Intervalo de muestras QMS Tacrolimus: de 1,0 a 30,8 ng/mL
Intervalo de muestras LC-MS/MS: de 0,8 a 29,5 ng/mL
Intervalo de muestras ARCHITECT Tacrolimus: de 2,4 a 28,1 ng/mL

Gráfico de dispersión para los resultados del QMS Tacrolimus comparado con el LC-MS/MS sistema 1 para muestras combinadas de trasplante de riñón, hígado y corazón.

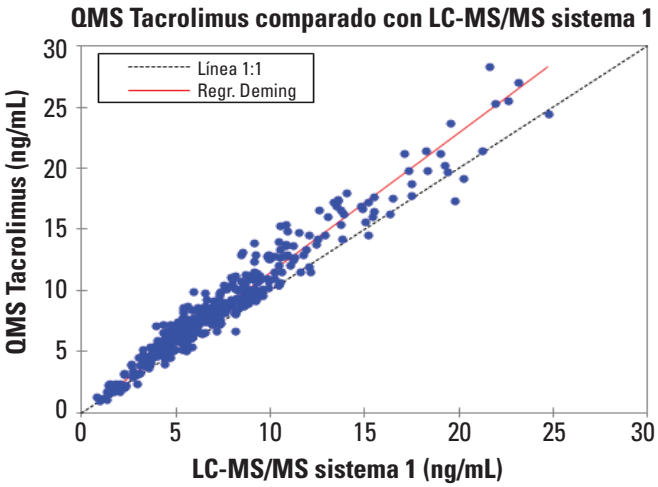


Gráfico de desviación Bland and Altman[17] Gráfico de dispersión para los resultados del QMS Tacrolimus comparado con el LC-MS/MS sistema 1 para muestras combinadas de trasplante de riñón, hígado y corazón. La desviación media se calcula como la diferencia entre el inmunoensayo QMS Tacrolimus y los resultados del LC-MS/MS sistema 1.

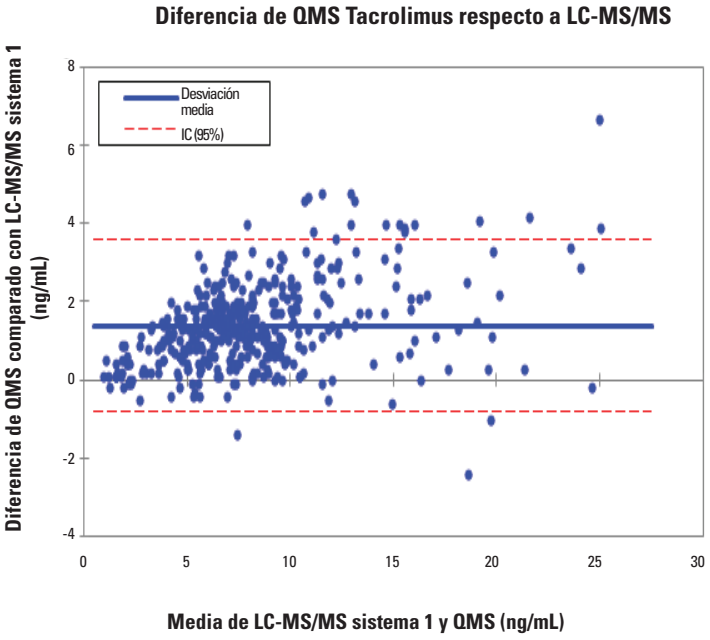


Gráfico de dispersión para los resultados del QMS Tacrolimus comparado con el Abbott ARCHITECT Tacrolimus para muestras combinadas de trasplante de riñón e hígado.

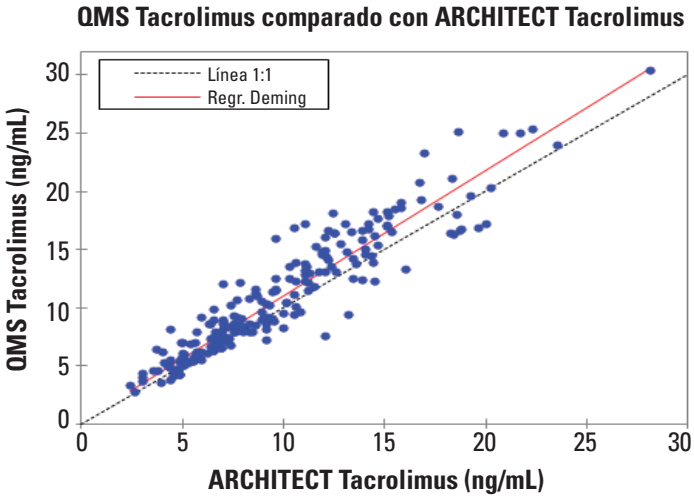
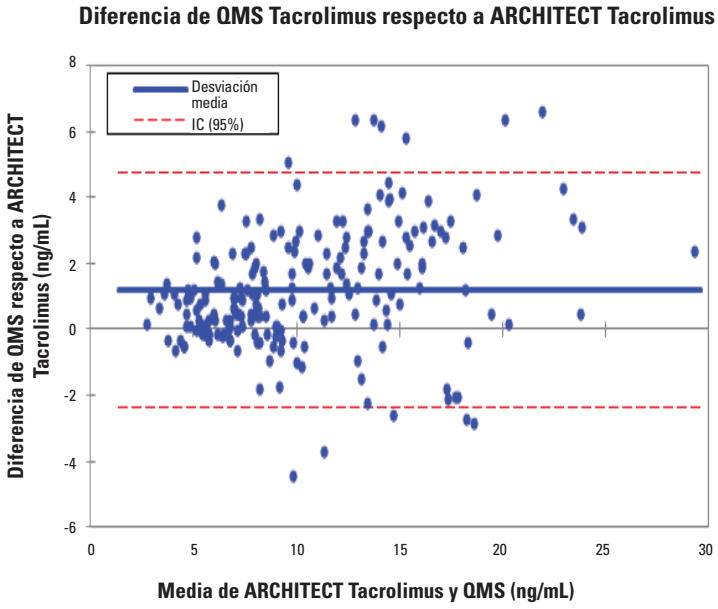


Gráfico de desviación Bland and Altman[17] Gráfico de dispersión para los resultados del QMS Tacrolimus comparado con el ensayo Abbott ARCHITECT Tacrolimus para muestras combinadas de trasplante de riñón e hígado. La desviación media se calcula como la diferencia entre el inmunoensayo QMS Tacrolimus y los resultados del ARCHITECT Tacrolimus.



Especificidad
Se realizaron estudios de especificidad utilizando como guía el protocolo CLSI EP7-A2.[18] Se analizó la reactividad cruzada para los principales metabolitos disponibles de tacrolimus. También se analizaron otras medicaciones administradas habitualmente con tacrolimus para determinar si estos compuestos pueden afectar a la determinación cuantitativa de tacrolimus mediante el inmunoensayo QMS Tacrolimus.

Se calculó la reactividad cruzada de los metabolitos mediante la fórmula:

$$\text{Reactividad cruzada (\%)} = \frac{\text{Concentración medida - Concentración prevista}}{\text{Concentración de reactividad cruzada}} \times 100$$

Reactividad cruzada con metabolitos de tacrolimus
En la tabla siguiente se muestra la reactividad cruzada del inmunoensayo QMS Tacrolimus respecto a los principales metabolitos de tacrolimus. Se añadieron los compuestos analizados a muestras de sangre humana completa que contenían dos concentraciones del fármaco tacrolimus y se analizaron en tres muestras idénticas. Se calculó el porcentaje de reactividad cruzada.

Metabolitos de tacrolimus	Concentración de metabolitos (ng/mL)	Concentración prevista (ng/mL)	Concentración medida (ng/mL)	Recuperación (%)	Reactividad cruzada (%)
M-I (13-O-dimetil)	20	5,8	7,6	131,0	9,2
	20	13,3	14,8	111,3	7,7
M-II (31-O-dimetil)	20	5,7	5,9	103,5	0,7
	20	13,2	13,1	99,2	-0,5
M-III (15-O-dimetil)	20	5,3	6,0	113,2	3,8
	20	12,4	13,0	104,8	2,7
M-IV (12-hidroxi)	3,5	14,6	18,7	128,1	117,1
	3,3	21,2	27,0	127,4	174,8
	20	5,0	6,1	122,0	5,7
	20	12,0	14,1	117,5	10,5
M-VII (13,15-O-didemetil)	20	5,4	7,3	135,2	9,3
	20	13,4	14,7	109,7	6,7
M-VII (13,15-O-didemetil) + M-VI (13,31-O-didemethyl)	20	5,4	5,8	107,4	2,2
	20	13,4	13,8	103,0	2,0

Recuperación (%) = (Concentración medida ÷ Concentración prevista) x 100

La reactividad cruzada observada del metabolito de tacrolimus M-IV fue de ≤ 174,8%. No se han evaluado los metabolitos de tacrolimus M-V y M-VIII para determinar la posible reactividad.

Las muestras de paciente con tacrolimus contenían bajas concentraciones de metabolitos de tacrolimus en comparación con el fármaco original, con aproximadamente el 6% de M-I, el 15% de M-II, el 6% de M-III y prácticamente indetectable el M-IV. [9,12,19]

Sustancias interferentes
Se realizaron estudios de interferencia utilizando como guía el protocolo CLSI EP7-A2.[18] El inmunoensayo QMS Tacrolimus se analizó con fármacos administrados en combinación con tacrolimus y con fármacos comunes para comprobar posibles interferencias. Los compuestos analizados se añadieron a muestras de sangre completa con aproximadamente 5 y 12 ng/mL de tacrolimus, y se analizaron utilizando el inmunoensayo QMS Tacrolimus. Se consideró que una recuperación de la concentración de tacrolimus superior a un 10% de error interferiría con el ensayo. Los compuestos analizados en las concentraciones detalladas en la tabla siguiente no mostraron interferencia con el ensayo. La recuperación porcentual media de tacrolimus osciló entre el 91% y el 109%.

Compuesto	Concentración (ng/mL)	Compuesto	Concentración (ng/mL)
Acetaminófeno	200.000	Sulfato de Kanamicina B	100.000
Acicloguanosina / Aciclovir	1.000.000	Cetoconazol	100.000
Alopurinol	50.000	Labetalol	17.100
Sulfato de amikacina	150.000	Lidocaína	100.000
Anfotericina B	100.000	Litio	35.000
Ampicilina	100.000	Lovastatina	20.000
Apresolina / Hidralazina	100.000	Metilprednisolona	100.000
Atenolol	40.000	Metoclopramida	100.000
Azatioprina	100.000	Minoxidil	60.000
Azitromicina	5.000	Sulfato de morfina	100.000
Bromocriptina / 2-Bromo-α-ergocryptina	8.000	Ácido micofenólico	100.000
Carbamazepina	120.000	N-acetilprocainamida	120.000

Tabla (continuación)

Compuesto	Concentración (ng/mL)	Compuesto	Concentración (ng/mL)
Cefazolina	150.000	Nadolol	1.200
Ceftriaxona	500.000	Naproxeno	100.000
Cefalosporina C	100.000	Nicardipina	500
Clorpromazina	50.000	Nicotina	20.000
Cloranfenicol	250.000	Nifedipina	100.000
Clordiazepóxido	20.000	Penicilina G	100.000
Cloroquina	1.500	Pentobarbital	100.000
Cimetidina	100.000	Fenobarbital	150.000
Ciprofloxacino	7.400	Fenitoína	100.000
Claritromicina	5.000	Prazosina	100.000
Clonidina	100	Prednisolona	100.000
Colchicina	90	Prednisona	100.000
Cortisona	1.200	Primidona	100.000
Ciclosporine / Ciclosporina A	10.000	Probucol	600.000
Diazepam	20.000	Procainamida	100.000
Digitoxina	100.000	Propoxifeno	4.000
Digoxina	10.000	Propranolol	40.000
Diltiazem	60.000	Quinidina	100.000
Disopiramida	100.000	Ranitidina	200.000
Eritromicina	200.000	Rifampina / Rifampicina	100.000
Etosuximida	300.000	Ácido salicílico	500.000
Everolimus	100	Sirolimus (Rapamicina)	300
Famotidina	10.000	Espectinomicina	100.000
Fluconazol	100.000	Estreptomicina	100.000
Flucitosina / 5-Fluorocitosina	40.000	Sulfametoxazol	150.000
Furosemida	100.000	Teofilina	250.000
Ganciclovir	1.000.000	Ticlopidina	150.000
Gemfibrozilo	100.000	Tobramicina	100.000
Gentamicina	120.000	Triamtereno	100.000
Hidroclorotiazida	40.000	Trimetoprima	40.000
Hidrocortisol	100.000	Ácido valproico	500.000
Ibuprofeno	400.000	Vancomicina	100.000
Itraconazol	100.000	Verapamilo	100.000
Sulfato de Kanamicina A	100.000		

Las siguientes sustancias endógenas potencialmente interferentes, cuando se analizaron con el inmunoensayo QMS Tacrolimus a las concentraciones indicadas, mostraron una recuperación entre el 92% y el 108%.

Sustancia potencialmente interferente	Concentración
Albúmina	12 g/dL
Bilirrubina	60 mg/dL
Colesterol	500 mg/dL
Creatinina	5 mg/dL
Triglicéridos	1.500 mg/dL
Ácido úrico	20 mg/dL
Gammaglobulina IgG	12 g/dL
Factor reumatoide	500 IU/mL
AHAM*	400 ng/mL
Hematocrito	12% - 64%

*AHAM = anticuerpos humanos antimurinos

Explicación de los símbolos utilizados

IVD	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
LOT	Código de lote/Numero de lote
REAGENT 1	Reactivo 1
REAGENT 2	Reactivo 2
REF	Número de catálogo
EXT	Reactivo de extracción
INGRED	Componentes
	Proteger de la luz
	Atención: Documentos de consulta incluidos
	Consultar las instrucciones de uso
	Límites de temperatura
	Fecha límite de uso/caducidad
	Fabricante
Cont.	Contenido del kit
	Material potencialmente peligroso a nivel biológico
	Nocivo
CE	Marca de conformidad CE

BIBLIOGRAFÍA

1. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomyces II. Immunosuppressive effect of FK-506 *in vitro*. J Antibiotics 1987; 40:1256-1265.
2. Bierer BE, Jin YJ, Fruman DA, et al. FK506 and rapamycin: molecular probes of T-lymphocyte activation. Transplant Proc 1991;23:2850-2855.
3. Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. Science 1991;251:283-287.
4. Thomson AW, Bonham CA, and Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. Ther Drug Monit 1995;17:584-591.
5. Griffith JP, Kim JL, Kim EE, et al. X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. Cell 1995;82:507- 522.
6. Jusko WJ, Thomson AW, Fung J, et al. Consensus document; therapeutic monitoring of tacrolimus (FK-506). Ther Drug Monit 1995;17:606-614.
7. Physicians' Desk Reference, 58th ed. Thomson PDR at Montvale, NJ. 2004; PROGRAF®: 1323-1327.
8. Lhoest GJ, Maton N, Latinne D, et al. 15-desmethyl FK-506 and 15,31-desmethyl FK-506 from human liver microsomes: isolation, identification (by fast atom bombardment mass spectrometry and NMR), and evaluation of in vitro immunosuppressive activity. Clin chem. 1994:40:740-744.
9. Gonschior AK, Christians U, Winkler M, et al. Tacrolimus (FK506) metabolite patterns in blood from liver and kidney transplant patients. Clin Chem. 1996;42:1426-1432.
10. Alak AM. Measurement of tacrolimus (FK506) and its metabolites: a review of assay development and application in therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. Ther Drug Monit. 1997;19:338- 351.
11. Jusko WJ. Analysis of tacrolimus (FK506) in relation to therapeutic drug monitoring. Ther Drug Monit. 1995:17:596-601.
12. Christians U, Pokaiyavanichkul T, Chan L, Tacrolimus, Applied Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Principals of Therapeutic Drug Monitoring. 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA 2005: 529-562.
13. Staatz CE, Willis C, Taylor PJ, and Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult kidney transplant recipients. Clin Pharmacol Ther. 2002;72:660-669.
14. PROGRAF® [prospecto del envase]. Deerfield, IL: Astellas Pharma US, Inc.; 2012.
15. Tholen DW, Kallner A, Kennedy JW, et al. NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Quantative Measurement Methods; Approved Guideline-Second Edition. NCCLS document EP5-A2 [ISBN 1-56238-542-9]. NCCLS, Wayne, PA, 2004.
16. Deming WE. Statistical adjustment of data. New York: Wiley, 1943. (Dover Publications edition, 1985; Dover Publications, New York)
17. Bland JM, Altman DG. "Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement". Lancet 327 (8476) 1986: 307–310.
18. McEnroe RJ, Burritt MF, Powers DM, et al. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document EP7-A2 [ISBN 1-56238-584-4]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2005.
19. Mancinelli LM, Frassetto L, Floren LC, Dressler D, Carrier S, Bekersky I, Benet L, and Christians U. The pharmacokinetics and metabolic disposition of tacrolimus: A comparison across ethnic groups. Clin Pharmacol Ther. 2001; 69:24-31.

Fabricante:
Microgenics Corporation
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538-6406 USA
US Toll Free: 800-626-0690

CE

EC REP
Representante autorizado en la U.E.:
Microgenics GmbH
Spitalhofstrasse 94
D-94032 Passau, Germany
Tel: +49 (0) 851 886 89 0
Fax: +49 (0) 851 886 89 10

Servicio de atención al cliente
Número gratuito en EE. UU.: 1-800-232-3342
Otros países: Pónase en contacto con el representante local de Microgenics.

Bio-Rad Lyphocheck® es una marca comercial registrada de Bio-Rad®.
MORE Diagnostics Controls son propiedad de MORE Diagnostics, Inc.
ARCHITECT es una marca comercial registrada de Abbott Laboratories®.
Todas las demás marcas son propiedad de Thermo Fisher Scientific Inc. y de sus subsidiarias.
© 2013 Thermo Fisher Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

Para obtener actualizaciones de prospectos, visite:
www.thermoscientific.com/diagnostics

10015557-2_ES
2013 07

Thermo SCIENTIFIC